

**ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

И.Б. Жамангаринова, Н.А. Лушникова, М.Р. Патышева

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Ю.Г. Кжышковска

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

**THE INFLUENCE OF THE FEATURES OF TUMOR ON THE PHENOTYPIC PROPERTIES OF
PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER**

I.B. Zhamangarinova, N.A. Lushnikova, M.R. Patysheva,

Scientific supervisor: Prof., Dr. Yu.Kzhyshkowska

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: inzhu_03.01@mail.ru

Abstract. *Monocytes as effectors of the innate immunity present an attractive target for diagnostic and therapy of diseases with inflammatory processes. Inflammation plays an important role in the process of origin and development of breast cancer [1]. In this study, subpopulations of monocytes associated with inflammation and expressing CD68, CD163, CD206, CD119 (INF-R), CD124 (IL-4R), stabilin-1 and the number of monocytes producing cytokines IL-1 β and TNF- α were quantitatively determined in peripheral blood in patients with breast cancer and healthy people by flow cytometry. The expression levels of genes associated with the inflammatory status of monocytes IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , stabilin-1, CCL18, were obtained in CD14⁺ mononuclear cell fraction with qPCR. Concentration of INF γ , IL-1 β , TNF- α was determined in serum of breast cancer patients and healthy donors by ELISA. Significant differences of variables received from patient and healthy donors were detected. The molecular subtype, the size of the primary tumor and the involvement of regional lymph nodes affect to phenotypic properties of monocytes in patients with breast cancer.*

Введение. Моноциты составляют около 8% лейкоцитарных клеток периферической крови (ПК). В случае онкологических заболеваний они интересны как предшественники дендритных клеток, миелоидных клеток-супрессоров, а также опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ). С другой стороны, моноциты являются непосредственными участниками воспаления, значимость которого признана при манифестации и течении рака молочной железы (РМЖ) [1]. Для ряда заболеваний, сопровождающихся воспалением (сепсис, вирусный гепатит В, ВИЧ инфекция, ревматоидный артрит, сахарный диабет 2 типа), выявлено наличие моноцитов, несущих поверхностные маркеры макрофагов, обладающих противовоспалительными свойствами (M2 макрофагов) – CD163, CD206 [2-5]. Такую поляризацию предполагают использовать в качестве прогностического признака заболевания [2,5]. Помимо уже известных маркеров стабиллин-1, представленный на макрофагах, активированных по альтернативному типу, также представляет интерес для изучения его экспрессии на моноцитах периферической крови [6]. Доказанная возможность дифференцироваться в ОАМ предполагает значимое

место моноцитов среди прочих клеток иммунной системы в патогенезе РМЖ, что, в свою очередь, позволяет предположить прогностическую ценность показателей, характеризующих состояние данного клеточного пула [7]. Целью данной работы была оценка взаимосвязи особенностей опухолевого процесса с субпопуляционным составом моноцитов ПК, а также экспрессией генов воспалительного профиля этих клеток у больных РМЖ.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 25 пациенток с впервые диагностированным инвазивным РМЖ в стадии T1-2N-2M0 с люминальными А и В, трижды негативным подтипами, прошедшие неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) и оперативное лечение. В качестве контрольной группы выступали 6 здоровых женщин. В ПК методом проточной цитофлуориметрии были определены субпопуляции моноцитов, экспрессирующие CD45, CD68, CD163, CD206, CD119 (INF- γ R), CD124 (IL-4R), стабиллин-1, а также количество моноцитов, продуцирующих цитокины ИЛ-1 β и ФНО- α . Для анализа уровня экспрессии генов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ТФР- β , CCL18, стабиллин-1 ассоциированных с воспалительным статусом моноцитов, из ПК методом магнитной сепарации была получена фракция CD14+ клеток, выделена тотальная РНК с последующей конверсией в кДНК и проведена количественная ПЦР в режиме реального времени. В сыворотке ПК был количественно определен уровень воспалительных (ИФН- γ , ИЛ-1 β и ФНО- α) и противовоспалительных (ИЛ-4) цитокинов методом ИФА.

Результаты. Известно, что характерной особенностью злокачественного процесса является системное воспаление [1]. Действительно, в нашем исследовании уровень воспалительных цитокинов ИФН- γ , ИЛ-1 β и ФНО- α у больных РМЖ превышал соответствующие показатели у здоровых лиц в 4,48; 4,48 и 1,83 раза ($p=0,07$; $p=0,002$ и $p=0,1$). Увеличение уровня воспалительных цитокинов в ПК сопровождалось статистически значимым снижением экспрессии генов ИЛ-1 $\beta=0,024$, ИЛ-6=0,07, ФНО- $\alpha=0,26$ и уменьшением количества моноцитов с внутриклеточной продукцией ИЛ-1 β по сравнению со здоровым контролем ($p<0,05$). У пациенток с РМЖ в ПК наблюдалось более высокое содержание CD68+ моноцитов в сравнении с соответствующим показателем в группе здоровых лиц ($1,88\pm0,45\%$ и $0,38\pm0,11\%$, $p=0,0078$). Другим значимым отличием в популяционной структуре моноцитов ПК у больных РМЖ явилось снижение M2 (CD163+) популяции и пула CD124+ моноцитов, экспрессирующих рецепторов к ИЛ-4 – главному индуктору M2-поляризации, по сравнению со здоровыми лицами. Если в группе контроля CD163+моноциты составляли 14,35% от всех моноцитов, то у больных злокачественным новообразованием данный показатель равнялся лишь 0,85% ($p=0,0009$). CD124+популяция моноцитов у больных РМЖ в 3,6 раза меньше, чем у здоровых лиц ($p=0,005$). При этом экспрессия генов-маркеров M2 в моноцитах и уровень сывороточного ИЛ-4 не имели различий в группах сравнения.

Проведенное исследование также выявило, что молекулярно-генетический подтип опухоли оказывает влияние на свойства моноцитов ПК. Так, наличие трижды негативного рака молочной железы сопровождалось увеличением в 10 раз количества моноцитов, продуцирующих ИЛ-1 β , по сравнению с соответствующими показателями у пациенток с люминальными подтипами РМЖ ($p=0,02$). При этом трижды негативный РМЖ приводил к гипоекспрессии гена ИЛ-6. Размер первичного узла исходно (до лечения) не оказывает влияния на молекулярный профиль моноцитов у больных РМЖ. Но на фоне проведения лечения моноциты изменяют свой профиль в зависимости от размера первичного узла. Так, у

больных с T2 после проведения 2 курсов НАХТ в моноцитах была выявлена меньшая экспрессия гена ИЛ-1 β , а после хирургического удаления первичного узла меньшая экспрессия гена ФНО- α по сравнению таковой у больных с T1. Вовлечение регионарных лимфатических узлов (N1) сопровождалось достоверным увеличением следующих субпопуляций моноцитов: CD119+ в 1,34 раза, CD124+ в 29 раз и CD163+ в 119 раз, снижением стабиллин-1 моноцитов в 3 раза, а также уменьшением экспрессии генов IL1 в 5 раз, TNFa в 7 раз, SI-CLP в 1,75 раза ($p < 0,05$).

Заключение. Наличие опухолевого процесса и его особенности (молекулярно-генетический подтип, размер первичного узла и степень метастатического поражения лимфатических узлов) оказывают статистически значимое влияние на субпопуляционный состав и экспрессию генов воспалительного профиля моноцитов ПК. Выявленные данные свидетельствуют о возможной прогностической ценности молекулярного профиля моноцитов при РМЖ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06037 «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ben-Baruch, A. (2012) The Tumor-Promoting Flow of Cells Into, Within and Out of the Tumor Site: Regulation by the Inflammatory Axis of TNFa and Chemokines. *Cancer Microenvironment*, no.5 (2), pp. 151-164.
2. Huang D., Sansass B., Jiang J., Gong Q., Wan M., Chen L., Yang W., Jin G., Yu D., Zhu M., Wei D., Zhang D., Inchauspé G., Zhang X., Zhu R. (2017) Soluble CD163 and their expression on monocytes, constituent potential molecular signature associated with liver inflammation and HBV-specific immune responses. *Journal of hepatology*, no.66 (2), pp. 1107-1336.
3. Kjargaard A.G., Rodgaard-Hansen S., Dige A., Krog J., Moller H.J., Tonnesen E. (2014) Monocyte Expression and Soluble Levels of the Haemoglobin Receptor (CD163/sCD163) and the Mannose Receptor (MR/sMR) in Septic and Critically Ill Non-Septic ICU Patients, *PLoS one*, no.9 (3), pp. 1932-6203.
4. Smiljanovic B., Radzikowska A., Kuca-Warnawin E., Kurowska W., Grün J. R., Stuhlmüller B., Bonin M., Sörensen T., Bruns A., Hermann S., Ohrndorf S., Aupperle K., Backhaus M., Burmester G.R., Radbruch A., Grützkau A., Maslinski W., Häupl T. (2017) Increased turnover of monocytes in patients with rheumatoid arthritis identified by transcriptome and cytometric profiling. *Annals of the Rheumatic Diseases*, no 76 (1), pp. 55.
5. Tuluc F., J. Meshki, Spitsin S.V., Douglas S.D. (2014) HIV infection of macrophages is enhanced in the presence of increased expression of CD163 induced by substance P. *Journal of leukocyte biology*, no. 96 (1) pp. 143-150.
6. Kzhyshkowska J., Gudima A., Moganti K., Gratchev A., and Orekhov A. (2016) Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, no. 43 (2) pp 66-77.
7. Condeelis J., Pollard J.W. (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, no.124 (2), pp. 263-6.